Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin im Städt.Krankenhaus Westend
(Direktor: Professor Dr.med.Günter Alexander Neuhaus)

Der Einfluß alkylierender Substanzen auf die Hämagglutininbildung sensibilisierter Mäusemilzzellen in der in-vivo-Kultur

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Judith Anne Whittaker

aus

Woonsocket, Rhode Island, U.S.A.

1969

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Freien Universität Berlin im Städt.Krankenhaus Westend
(Direktor: Professor Dr.med.Günter Alexander Neuhaus)

Der Einfluß alkylierender Substanzen auf die Hämagglutininbildung sensibilisierter Mäusemilzzellen in der in-vivo-Kultur

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an der

Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Judith Anne Whittaker
aus

Woonsocket, Rhode Island, U.S.A.

Dekan: Professor Dr.med.Hans Heinz N a u m a n n

Referent: Professor Dr.med.Heinrich G e r h a r t z

Korreferent: Professor Dr med.Günter N e u h a u s

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19.6 1969

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Material und Methoden	3
C. Ergebnisse	8
1) Bestimmung der LD_{50}^{1}	8
2) Orientierende Testung verschieden hoher Dosen einzelner Substanzen	9
3) Vergleichende Testung äquitoxischer Dosen der wirksamsten Präparate	11
D. Besprechung der Ergebnisse	13
E. Zusammenfassung	18
F. Tabellen	19
G. Literatur	35
Lebenslauf	

A. Einleitung und Problemstellung

Der Einsatz zytostatischer Substanzen in der immunsuppressiven Therapie ist nur dann gerechtfertigt, wenn sie zuvor im Tierversuch eine immunsuppressive Wirksamkeit zeigten, die derjenigen schon bekannter Immunsuppressiva zumindest nahekommt. Fast alle Zytostatika sind in diesem Sinne einer mehr oder weniger umfassenden vergleichenden Testung unterworfen worden. Breit angelegte Übersichten machten jedoch deutlich, daß ein Vergleich verschiedener Gruppen von Versuchsergebnissen die Bewertung einzelner Substanzen mitunter höchst widersprüchlich gestaltet (14). Dem liegen methodische Faktoren zugrunde.

Hierzu zählen einmal Unterschiede des als Testmodell benutzten immunologischen Grundvorganges (7). Die Bildung agglutinierender oder präzipitierender Antikörper, die Autoantikörperbildung, die Hypersensitivitätsreaktion oder die Transplantatabstoßung sind immunologische Phänomene, deren zytologisches Substrat ohne Zweifel gegenüber medikamentösen Einflüssen jeweils eine individuelle Empfindlichkeit besitzt.

Auch innerhalb eines einzelnen Testmodells ist die Konstanz verschiedener Faktoren zu gewährleisten. Zahl und Eigenschaften der i m m u n o l o g i s c h e n S t a m m z e l l e n hängen ab von Species, Geschlecht, Alter, Allgemeinzustand des Versuchstieres, von konkurrierend an den Stammzellen angreifenden immunologischen oder hämopoetischen Stimuli sowie von der Art einer etwaigen Sensibilisierung gegen das T e s t a n t i g e n. Dessen Dosis und Applikationsweise wiederum bestimmt Stärke sowie Beeinflußbarkeit der Testreaktion. Die T e s t s u b s t a n z sollte nach Höhe und Häufigkeit der Einzeldosen sowie nach Applikationsweg und -zeitpunkt gleich-

mäßig verabfolgt werden; als Vergleichsbasis sollten äquitoxische Dosen dienen. Schließlich hat die K o n t r o l l e des Versuchsablaufes zum Reaktionsbeginn und zum Zeitpunkt der Medikation in einer festen zeitlichen Beziehung zu stehen (14).

Ein standardisiertes Testsystem zur Prüfung möglicher immunsuppressiver Effekte hat, diesen Erwägungen folgend, die folgenden Gesichtspunkte zu berücksichtigen (9,14):

1. Wahl eines einfachen, quantitativ leicht faßbaren Immunvorganges als Versuchsgrundlage,
2. Experimentalbedingungen, unter denen die wichtigsten immunologischen Variablen vorherbestimmt werden können,
3. Anwendung der Testsubstanzen unter Standardbedingungen.

Nachfolgend werden Ergebnisse einer Versuchsserie mitgeteilt, die diesen Forderungen gerecht zu werden suchte (9).
Versuchsgrundlage war eine Sekundärreaktion von Mäusemilzzellen gegen Schaferythrozyten, deren Stärke am Titer agglutinierender, Schaferythrozyten-spezifischer Antikörper gemessen wurde. Im Gegensatz zu Primärreaktionen schien eine Sekundärreaktion dem Testmodell insofern von Vorteil, als ihr Titeranstieg rasch, hoch und individuell wenig variabel auszufallen pflegt.
Ausgangspunkt der Reaktion waren isolierte Milzzellen,die in strahleninaktivierten Wirtstieren kultiviert wurden. Der Vorteil dieser "in-vivo-Kultur"-Technik (15) war folgender: die immunologischen Stammzellen der Testreaktion konnten bei Versuchsbeginn zahlenmäßig festgelegt und aus einem qualitativ homogenen Zellpool gewonnen werden; gleichzeitig ließ sich dadurch die Pufferung immunsuppressiver Effekte unterbinden, wie sie durch das große Stammzellreservoir im intakten Tier gegeben ist (9, 14). Getestet wurden Einzeldosen von 11 verschiedenen alkylierenden Substanzen, die regelmäßig zum gleichen Zeitpunkt in der frühen Latenzphase appliziert wurden.

Abgesehen von einigen Vorversuchen gliederten sich die Untersuchungen in drei Teile:

1. Bestimmung der LD_{50}^{1} (chronische Toxizität),
2. orientierende Testung verschieden hoher Dosen der einzelnen Substanzen,
3. vergleichende Testung äquitoxischer Dosen der wirksamsten Präparate.

B. Material und Methoden

Antigen: Als Antigen wurden Schaferythrozyten (SRBK) der Behringwerke AG verwendet (Hammelblut konserviert, 3o ml Hammelblut und 2o ml Stabilisator). Die Packungen wurden jeweils verschlossen bei +4° gelagert, bis sie unter Einhaltung der offiziellen Verfallsdaten Verwendung fanden.

Für die Sensibilisierung der Spender sowie für die in-vivo-Kultur wurden Proben SRBK zunächst bei 25oo U/min 5 min in der Stockzentrifuge zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sediment (ca. 1-2 ml) mit o,9%iger NaCl-Lösung (ad 1o ml) zweimal gewaschen (25oo U/min, 5 min). Aus dem letzten Sediment wurde sodann für die Sensibilisierung der Spender eine 1 %ige Suspension hergestellt; jeder Milzzellspender erhielt 1 ml dieser Suspension entsprechend 25o x $1o^6$ SRBK intraperitoneal verabfolgt. Für die Erfordernisse der in-vivo-Kultur wurde das letzte Sediment zunächst mit o,9%iger NaCl-Lösung verdünnt, der Zellgehalt der Suspension durch Doppelbestimmung in der Schilling-Zählkammer ermittelt und die Suspension mit o,9%iger NaCl schließlich so verdünnt, daß in der Endsuspension 5oo x $1o^6$ SRBK pro ml enthalten waren.

Versuchstiere: Als Versuchstiere dienten $C31F_1$- und $1C3F_1$-Mäuse beiderlei Geschlechts, die aus C3H/Anf Cum- sowie lol/Cum-Inzuchtstämmen eigener Haltung gekreuzt wurden ($C31F_1$ = C3H x lol; $1C3F_1$ = lol x C3H). Die Inzuchtstämme wurden 1965 von der Cumberland View Farm, Clinton,Tenn. (USA) bezogen und seither im eigenen Tierstall durch Geschwisterpaarung fortgezüchtet. Die genetische Konstanz der Stämme konnte durch wiederholte Hauttransplantationen gesichert werden. Die Haltung der Tiere erfolgte in Käfigen mit maximal 12 Tieren bei konstanten Klimabedingungen (ca. 6o-65 % Luftfeuchtigkeit, 22^o Raumtemperatur, Ozonbeimengung von o,1 ml/m^3 Raumluft) und freiem Zugang zu Wasser und Futter (Altromin-Mischfutter). Als M i l z z e l l s p e n d e r dienten männliche $C31F_1$-Mäuse, die im Alter von 8 Wochen sensibilisiert wurden und mit 12 Wochen Benutzung fanden.

Als W i r t s t i e r e dienten Tiere beiderlei Geschlechts und beider Kreuzungen unabhängig von ihrem Alter. Das Gewicht der rund 8oo Empfängertiere betrug 27,6 $\pm$ 4,7 g (arithmetisches Mittel mit Vertrauensbereich bei 2P = o,o5). Durch einen Vorversuch wurde gesichert, daß auch extreme Gewichtsdifferenzen ohne Einfluß auf die Versuchsergebnisse blieben. Je 12 $1C3F_1$-Mäuse von 22 bzw. 32 g Körpergewicht erhielten konstante Inokula von sensibilisierten Milzzellen sowie Antigen (25 x 10^6 Milzzellen plus 25o x 10^6 SRBK intravenös). Die am 8. bzw. 12.Tag der Kultur beobachteten Serumtiter lagen bei 2o,3 $\pm$ o,7 bzw. 2o,o $\pm$ o,9 sowie 19,8 $\pm$ o,1 bzw. 19,4 $\pm$ o,8 (arithmetische Mittel mit Vertrauensbereich bei 2P = o,o5) und waren auf dem 5 %-Niveau nicht signifikant different.- In ähnlicher Weise wurde die Verwendbarkeit strahleninaktivierter $C31F_1$- sowie $1C3F_1$-Mäuse als Wirtstiere für die Kultur männlicher $C31F_1$-Milzzellen geprüft. Der Anteil männlicher bzw. weiblicher Tiere wurde bei beiden Typen von Empfängern bei jeweils 5o % gehalten. Bemerkenswerterweise ergab sich hier zwischen beiden Versuchsgruppen eine signifikante Differenz (2P=o,o5);

da sie absolut jedoch gering war (log_2-Titer 12,3 gegen 13,o), kamen dennoch $C31F_1$- und $1C3F_1$-Kreuzungen gleichermaßen zur Anwendung.

Strahleninaktivierung der Wirtstiere: Die Inaktivierung der Milzzellempfänger wurde im Strahleninstitut der Freien Universität Berlin (Städt.Krankenhaus Westend) mit einem Müller-RT 25o-Gerät vorgenommen (25o kv, 15 mA, 1,5 mm Cu, Feldgröße lo x 15 cm, Fokus-Hautabstand 6o cm). Während der Bestrahlung befanden sich jeweils 12 Tiere in einzelnen Abteilungen eines Plexiglasbehälters, der um eine vertikale Achse rotierte. Die applizierte Strahlendosis (8oo r) inaktivierte die Wirtstiere in einem solchen Maße, daß bei gleichzeitiger intravenöser Gabe von $25o \times lo^6$ SRBK in 1 ml Volumen auch nach 8 - 12 Tagen der Titer SRBK-spezifischer Agglutinine in ihrem Serum nur $1,3 \pm 1,5$ ($n = 7$, $2P = o,o5$) betrug.

In-vivo-Kultur(15): Unmittelbar vor Kulturbeginn wurden Gruppen von Spendertieren getötet, deren Milzen unter sterilen Bedingungen entnommen und mit Pinzette und Nadel bei fortlaufender Zugabe von o,9%iger NaCl-Lösung in Petrischalen zu einer Zellsuspension verarbeitet. Nach Doppelbestimmung ihres Gehaltes an kernhaltigen Zellen in der Schilling-Kammer wurde die Milzzellsuspension so weit mit o,9%iger NaCl-Lösung verdünnt, daß in 1 ml $5o \times lo^6$ Milzzellen enthalten waren. o,5 ml Milzzellsuspension und o,5 ml SRBK-Suspension entsprechend $25 \times lo^6$ Milzzellen und $25o \times lo^3$ SRBK wurden sodann intravenös auf strahleninaktivierte Empfänger übertragen. Dieses Inokulum stellte den Ausgangspunkt der Testreaktion dar, die nunmehr im Körper der Wirtstiere ("in-vivo-Kultur") in Gang kam. Dabei war es allein die Aufgabe des Wirtes, das Inokulum zu

ernähren, nicht aber etwa gegen das eingebrachte Antigen mitzureagieren.
Ein Teil der Tiere blieb in der Folge unbehandelt (Kontrollgruppen), andere Tiere wurden zytostatisch behandelt (Experimentalgruppen). In allen Gruppen wurden am 4.,8. und 12.Tag der Kultur durch Punktion der Periorbitalvenen bzw. durch Eröffnen der Zervikalgefäße Proben von Blut für die serologischen Untersuchungen gewonnen. Angesichts der Ergebnisse von REWALD und PELLITERO (2o) wurde in einem weiteren Vorversuch geprüft, ob die wiederholte Blutentnahme (periorbital/zervikal) an einem Tier zu einer Stimulierung der Antikörperbildung führt. In-vivo-Kulturen wurden in der soeben beschriebenen Art angesetzt. Gruppe A wurde lediglich am 12.Tag zervikal entblutet, Gruppe B lieferte zusätzlich am 8. und Gruppe C am 4.und 8.Tag Blut aus der Periorbitalvene. Die 12-Tagetiter der drei Gruppen waren mit 18,1 $\pm$1,3 (A), 18,2 $\pm$ o,9 (B) und 18,9 $\pm$ 1,1 (C) nicht signifikant different (2P = o,o5; n = 8, 12 bzw. 1o).

Testsubstanzen: Die Testsubstanzen wurden als Einzeldosen von unterschiedlicher Höhe 18 Stunden nach Beginn der in-vivo-Kultur, d.h. zu Beginn der serologischen Latenzphase, in der Regel intraperitoneal in einem Gesamtvolumen von je 1 ml verabfolgt. Lediglich Busulfan und Myelobromol wurden, ebenfalls in 1 ml Volumen, durch die Schlundsonde appliziert. Diese beiden Substanzen waren zudem in 5%iger Gummiarabicum-Lösung suspendiert, während alle übrigen Substanzen in salinischer Lösung zur Anwendung kamen.
Im einzelnen handelte es sich um die folgenden 11 alkylierenden Substanzen (11):

Cyclophosphamid: Endoxan(R), Cytoxan(R)
Z 4828: Asta Z 4828 - N,N,N'-Tris-(2-chloräthyl)-N'-O-propylenphosphorsäureester-diamid
Z 4942: Asta Z 4942 - 2,3-[N,N'-Bis (2-chloräthyl)] - diamido-1,3,2-oxazaphosphoridinoxyd -(2)
Tretamin: TEM(R), Triaethylenmelamin(R)
Trenimon: Trenimon (Bayer)(R)
Thio-TEPA: Thio-Tepa(R)
Melphalan: Alkeran(R), L-Sarcolysin(R)
Chlorambucil: Leukeran(R)
Manno-mustin: BCM(R), Degranol(R)
Busulfan: Myleran(R)
Myelobromol: Myelobromol (Lentia AG.)(R)

Serologische Untersuchungen: Die Seren von verschiedenen Zeitpunkten eines Versuches wurden tiefgefroren bis zum Versuchsende aufbewahrt und dann nach der Serienverdünnungsmethode (16) auf SRBK-agglutinierende Antikörper untersucht. Hierzu wurde eine Reihe Rundbodenröhrchen (Länge x Ø = 7o x 8 mm) mit je o,1 ml o,9%iger NaCl-Lösung beschickt und in ihr o,1 ml Serum unter Verwendung von o,1 ml-Pipetten (o,1 ml in 1 / looo ln $2o^{o}$) heruntertitriert. Je Röhrchen wurden sodann o,1 ml einer 1 %igen SRBK-Suspension zugefügt. Die Konstanz der antigenen Eigenschaften der Testerythrozyten wurde von Versuch zu Versuch durch Titration gegen ein Standardserum überprüft. Nach Schütteln inkubierten wir die Ansätze 5 min bei Zimmertemperatur und zentrifugierten danach 2 min bei 18oo U/min. Die Ablesung erfolgte nach vorsichtigem Aufschütteln des Bodensatzes. Der Titer des Untersuchungsmaterials war definiert als die höchste Verdünnungsstufe, die noch makroskopisch eine eindeutige Agglutination zeigte ($\log_2$-Titer = $\log_2$ des reziproken Werts des Titers).

C. Ergebnisse

1. Bestimmung der LD_{50}^{1}: Die Bestimmung der chronischen Toxizität erfolgt i.a.nach einmaliger Gabe der verschiedenen Testsubstanzen in salinischer Lösung intraperitoneal; Busulfan sowie Myelobromol wurden in 5%iger Gummiarabicum-Lösung durch die Schlundsonde verabfolgt. Die Einzeldosis war jeweils in 1 ml Volumen untergebracht. Sofern sich aus der Literatur (vgl.Tab.1) Anhaltspunkte für die Höhe der sicher wirksamen Einzeldosen ergaben, wurde die Toxizitätsbestimmung mit einer Dosis begonnen, die mit Sicherheit bei 1oo % der Tiere zum Tode führen mußte. Neben dieser höchstdosierten Gruppe wurden i.a. 5 - 6 weitere Gruppen von Tieren mit Einzeldosen behandelt, die jeweils 5o % der nächsthöheren Testdosis ausmachten. Pro Gruppe wurden 8 - 1o Tiere eingesetzt, und zwar $C3lF_1$-Mäuse beiderlei Geschlechts, deren Alter mit 1o- 12 Wochen etwa dem Alter der Milzzellspender zum Zeitpunkt ihrer Verwendung entsprach. Die Absterbefolge innerhalb der einzelnen Gruppen wurde über 21 Tage täglich vermerkt; zu diesem Zeitpunkt hatte sich der Prozentsatz überlebender Tiere in allen Fällen stabilisiert. Aus den Ergebnissen dieser Beobachtungen wurde nach der Formel von KÄRBER (12) die LD_{50}^{1} errechnet. Die Ergebnisse dieser Berechnungen sind in Tabelle 1 vermerkt und neben LD_{50}^{1} - und LD_{50}^{5} - Werte gestellt, wie sie für einige unserer Testsubstanzen in der Literatur zu finden waren. Unsere Werte zeigten bei nicht wenigen Testsubstanzen, so bei Cyclophosphamid, Tretamin, Thio-TEPA, Melphalan, Chlorambucil und Manno-mustin, z.T. erhebliche Abweichungen von den entsprechenden Vergleichswerten. Sie betrugen im Durchschnitt +3o bis +5o %, erreichten aber beim Melphalan und Chlorambucil sogar mehr als +1oo % der in der Literatur erwähnten Befunde. Allerdings ist zu bemerken, daß letztere unter anderen technischen Bedingungen

erarbeitet wurden. Dies bezieht sich nicht nur auf den Applikationsmodus (subkutane und intravenöse Gabe), sondern auch auf die Qualität der benutzten Tiere. So wurde teils mit Mäuseinzuchtstämmen (AKR bei Tretamin, Swiss bei Manno-mustin), teils mit Ratten (Melphalan und Chlorambucil) gearbeitet; es ist aber bekannt, daß Mäuseinzuchtstämme ebenso wie Ratten eine wesentlich höhere toxikologische Empfindlichkeit aufweisen als die von uns benutzten, recht widerstandsfähigen Hybriden.

2. Orientierende Testung verschieden hoher Dosen der einzelnen Substanzen: Im Anschluß an die Toxizitätsbestimmung, in einigen Fällen auch ihr parallel laufend, wurde in orientierenden Versuchen die Wirkung verschieden hoher Einzeldosen der diversen alkylierenden Sub - stanzen geprüft. I.a.lag die höchste Testdosis bei etwa 1/4 bis 1/2 der LD_{5o}^{1} , wie sie von uns selbst ermittelt bzw. in der Literatur gefunden wurde; von dieser Maximaldosis ausgehend wurden 3 - 4 niedrigere Dosen getestet, die jeweils 5o % der nächsthöheren Dosis betrugen. Nebenher lief eine unbehandelte Kontrollgruppe. Jeder Versuch bestand somit aus 5 - 6 Gruppen, deren Tierzahl zwischen 5 und 1o schwankte.

Auf Tabelle 2 sind die Einzelwerte dieser orientierenden Prüfungen aufgetragen. Als erstes ist zu erkennen, daß es durch die Kombination einer subletalen Vorbestrahlung mit höheren Zytostatikadosen in den entsprechenden Experimentalgruppen zu erheblichen Tierverlusten kam (Gruppe Z 4942, Tretamin, Trenimon, Chlorambucil). So lückenhaft diese Zusammenstellung dadurch auch wurde, erlaubte sie doch eine klare Abschätzung der immunsuppressiven Wirksamkeit der einzelnen Substanzen unter den gegebenen Bedingungen. Drei von ihnen, nämlich Cyclophosphamid, Z 4828 und Z 4942, zeigten einen hervorragenden Effekt. Eine Aussage über die Wirksamkeit der übrigen Test -

substanzen konnte dagegen nicht auf den ersten Blick getroffen werden.

Tabelle 3 zeigt die arithmetischen Mittel mit ihren Vertrauensbereichen (2P = o,o5) für die in Tabelle 2 zusammengestellten Experimentalbefunde. Zugleich wurde hier, ebenfalls auf dem 5 %-Niveau, dargestellt, welche Experimentaldaten signifikant von den jeweiligen Kontrollen abweichen. Nunmehr ist zu erkennen, daß außer den zuvor erwähnten drei Cyclophosphamid-Verwandten auch andere Prüfsubstanzen einen signifikanten immunsuppressiven Effekt zeigten. Am ausgeprägtesten war er bei Manno-mustin, Melphalan, Chlorambucil und Tretamin, geringer bei Myelobromol, Thio-TEPA und Trenimon. Alle diese Substanzen waren allerdings erst in relativ toxischer Dosis wirksam (ca. 1/4 - 1/2 der LD_{5o}^{1}), während schon 1/8 der LD_{5o}^{1} bei Cyclophsophamid, Z 4828 und Z 4942 genügte, um ganz ausgeprägte Effekte zu setzen. Das Bemerkenswerte bei den gering immunsuppressiven Stoffen war dabei, daß sich bei ihnen der immunsuppressive Effekt vorzugsweise am 4.Tag oder spätestens am 8.Tag der in-vivo-Kultur zeigte. So finden sich in Tabelle 3 am 4.Tag 4o, am 8.Tag und ebenso am 12.Tag je 48 Ergebnisse aus Experimentalgruppen. Der Anteil signifikant von den jeweiligen Kontrolldaten differierender Experimentalwerte aber betrug am 4.Tag 23, am 8.Tag 19 und am 12.Tag 16, entsprechend 57,5, 39,5 bzw. 33,3 %. Allgemein ließ sich daraus schließen, daß ein immunsuppressiver Effekt am ehesten zu Beginn, mitunter auch noch bei Ende der serologischen log-Phase, nur ausnahmsweise aber während der Stationärphase bemerkbar wird. In diesem Sinne konnte sogar das hochwirksame Versuchspräparat Z 4828 in niedriger Dosis die 8 - 12-Tage-Titer nicht signifikant beeinflussen. An Tabelle 4 ist das gleiche Prinzip abzulesen. Hier finden wir die immunsuppressive Wirkung von jeweils etwa 1/4 LD_{5o}^{1} der verschiedenen Testsubstanzen abhängig vom Zeitpunkt der sero-

logischen Untersuchungen aufgetragen. Da, wie schon bemerkt, in einigen Fällen Toxizitätstestung und Immunsuppressionsprüfung einander parallel liefen, wurde nicht in allen Fällen exakt 1/4 LD_{50}^{1} zum Einsatz gebracht. Ein Vergleich der ebenfalls in Tabelle 4 aufgetragenen Soll- und Ist-Werte zeigt aber,daß nur in wenigen Fällen (Z 4942, Thio-TEPA und Myelobromol) eine nennenswerte Differenz zwischen ihnen vorlag. Es war also möglich, auf der Basis dieser orientierenden Untersuchungen einen Vergleich der immunsuppressiven Wirkung äquitoxischer Dosen der verschiedenen Testsubstanzen vorzunehmen. Dabei wurden die Ergebnisse der jeweiligen Kontrollgruppen = loo gesetzt und die Experimentalwerte, bezogen darauf, in % relativer Aktivität ausgedrückt (17). Im Sinne der zuvor gemachten Beobachtungen lagen die Resultate dieser Umrechnung am 4.Tag deutlich niedriger als am 8.-12.Tag der Kultur. Am 8.Tag bewirkten äquitoxische Dosen von drei Substanzen (Cyclophosphamid, Z 4828 und Z 4942) eine Immunsuppression unter o,ol %, von drei weiteren Substanzen unter 25 % (Chlorambucil, Manno-mustin und Melphalan), während die übrigen keinen wesentlichen immunsuppressiven, wenn nicht gar einen stimulierenden Effekt setzten.

3. Vergleichende Testung äquitoxischer Dosen der wirksamsten Präparate: Der Abstand in der Wirksamkeit der drei Cyclophosphamidderivate gegenüber den nächstfolgenden Substanzen (Chlorambucil und Manno-mustin) war dabei sehr beträchtlich. Erstere senkten die Antikörperaktivität am 8.Tag der Kultur unter o,ol %, letztere eben unter 25 % der jeweiligen Kontrollen. Unter diesen Umständen schien es gerechtfertigt, auf der Grundlage der orientierenden Untersuchung einen echten Vergleich äquitoxischer Dosen allein der drei Spitzenpräparate anzustreben. Gruppen zu je 24 strahleninaktivierten Wirtstieren bekamen das übliche

Milzzell-SRBK-Inokulum sowie, 18 Stunden später, 1/8 LD_{50}^{1} Cyclophosphamid bzw. Z 4828 bzw. Z 4942 intraperitoneal (entsprechend 85, 5o bzw. 1o4 mg/kg); eine vierte Gruppe blieb zytostatisch unbehandelt. In Abständen von 2 Tagen wurden serologische Untersuchungen vorgenommen, deren Ergebnisse in Tabelle 5 niedergelegt worden sind (arithmetische Mittel mit Vertrauensbereich bei 2P = o,o5). Wie nicht anders erwartet, bewirkten alle drei Zytostatika eine signifikante Immunsuppression. Ein Vergleich der drei Substanzen im t-Test wies das Präparat Z 4828 als am geringsten immunsuppressiv aus. Die mit Cyclophosphamid bzw. Z 4942 behandelten Gruppen hatten eine auf das 4-fache, von 2 auf etwa 8 - 1o Tage verlängerte Latenzphase und befanden sich dementsprechend bei Versuchsende eben in der frühen log-Phase. Dementsprechend bestanden zwischen beiden Gruppen bis zum 8.Tag keine signifikanten Differenzen; am 1o.und 12.Tag war der immunsuppressive Effekt des Z 4942 signifikant stärker als der des Cyclophosphamid (2P = o,o5).

D. Besprechung der Ergebnisse

Angeregt von den klinischen Erfordernissen wurden im Laufe der letzten Jahre eine Vielzahl chemischer Substanzen, vornehmlich aber Zytostatika, auf ihre immunsuppressive Wirkung geprüft. An tierexperimentellen Einzelbefunden besteht somit kein Mangel (1,6,7,14,21,22,26,27). Ein abschließendes Urteil über Vorzüge und Nachteile der einzelnen Testsubstanzen ist dennoch z.Zt. nicht möglich, sieht man einmal von den als besonders wirksam befundenen Medikamenten wie Cyclophosphamid und Azathioprin ab. Die Ursache dafür ist darin zu suchen, daß die einzelnen Arbeitsgruppen jeweils nur ein recht enges Spektrum von Substanzen in ihre Testungen einbezogen, ohne unter standardisierten Bedingungen zu arbeiten. Durch eine umfangreiche Synopsis wurde erst kürzlich von MAKINODAN u.Mitarb. (14) belegt, daß Ergebnisse wie Vergleichbarkeit derartiger Testungen in großem Maße vom benutzten Testmodell sowie Unterschieden der immunologischen Variablen abhängig sind. Ein Vergleich der Befunde verschiedener Arbeitsgruppen könne nur dann vorgenommen werden, wenn äquitoxische Dosen der Prüfsubstanzen an einem Standardtestmodell zur Anwendung kämen. An Anpassung an die von MAKINDON gemachten Überlegungen wurde in der vorliegenden Arbeit eine Versuchsserie begonnen, die eine fortlaufende Testung immunsuppressiver Agentien unter Standardbedingungen zum Ziele hat. Als Testmodell diente eine Sekundärreaktion isolierter Mäusemilzzellen gegen ein korpuskuläres Antigen (Schaf - erythrozyten) unter in-vivo-Kulturbedingungen. Es wurden alle möglichen Maßnahmen getroffen, um die qualitative und quantitative Konstanz der immunologischen Stammzellen zu sichern, von denen die Testreaktion ihren Ausgang nahm. Vorgelegt werden Ergebnisse, die an einer Gruppe von 11 alkylierenden Substanzen erarbeitet wurden.

Die Toxizitätsbestimmung wurde an $C31F_1$-Hybriden vorgenommen, die etwa ebenso alt waren wie die $C31F_1$-Milzzellenspender zum Zeitpunkt ihrer Tötung. Die Werte, die auf diese Art als LD_{50}^{1} unserer Hybriden zustande kamen (Tab .1), differierten z.T. erheblich von Vergleich - werten der Literatur. Stets handelte es sich um Plus - abweichungen. Sie beliefen sich in der Regel auf 3o - 5o %, in zwei Fällen, nämlich bei Melphalan und Chlorambucil, sogar auf mehr als loo %. Im wesentlichen kann angenommen werden, daß sie auf die besondere Resistenz der benutzten Kreuzung zurückzuführen sind, während die jeweiligen Vergleichswerte an Inzuchtstämmen bzw. Ratten ermittelt wurden, die erfahrungsgemäß von höherer Empfindlichkeit gegenüber toxischen Einflüssen zu sein pflegen. Die Untersuchungen von SCHMIDT und Mitarb. (25) mit einem breiten Spektrum von Zytostatika und unterschiedlichen Ratten- und Mäusestämmen machen den Einfluß der individuellen Resistenz auf das Ergebnis von Toxizitätsbestimmungen besonders deutlich erkennbar.

Auf den ersten Blick schienen etwa die Hälfte der untersuchten Alkylantien immunsuppressiv wirksam zu sein (Tab.3), voran die Cyclophosphamidgruppe (Cyclophosphamid, Z 4828, Z 4942), ferner auch Manno-mustin, Melphalan und mit gewisser Einschränkung noch Chlorambucil. Die übrigen 5 Testsubstanzen führten allenfalls in Höchstdosen zu einer Immunsuppression, wobei bemerkt werden konnte, daß diese überwiegend zu Beginn der Testreaktion (4.Tag), nur ausnahmsweise aber an deren Ende (12.Tag) der Fall war. Dies gab Anlaß, summarisch zu prüfen, wie häufig ein signifikanter immunsuppressiver Effekt am 4.,8. bzw. 12.Tag der in-vivo-Kultur zu beobachten war. Die Prüfung wurde vertikal durch sämtliche Testgruppen vorgenommen und hatte zum Ergebnis, daß am 4.Tag fast 6o %, am 12.Tag aber nur etwa 3o % der Experimentalgruppen unter den jeweiligen Vergleichmittelwerten lagen (Tab.3). Der Schluß erscheint zulässig, daß geringe immunsuppressive Wirkungen

vornehmlich in den Frühphasen der Immunreaktion nachweisbar sind, in unserem Fall (vgl.Tab.5) in der frühen log-Phase, daß sie aber in der Folge durch das antikörperbildende System kompensiert werden können. Ein differenzierteres Bild über die immunsuppressive Wirkung der verschiedenen Substanzen ergab sich bei einem Vergleich äquitoxischer Dosen (ca. 1/4 LD_{50}^{1}) (Tab.4). Am 8.Tag der Testreaktion führten ganz eindeutig die Präparate der Cyclophosphamidgruppe, die die Antikörpermenge unter o,ol % der Kontrollen zu senken vermochten. In weitem Abstand folgten dann Chlorambucil und Manno-mustin, die immerhin noch eine Immunsuppression unter 25 % der Vergleichswerte bewirkten. Alle übrigen Substanzen waren auf der genannten Vergleichsbasis bei Beginn der Stationärphase praktisch unwirksam. Die Frage, welches der drei an der Spitze stehenden Präparate den stärksten immunsuppressiven Effekt hatte, wurde durch einen Zusatzversuch untersucht (Tab.5). Ihm zufolge war Z 4828 das Cyclophosphamidderivat mit der geringsten Wirksamkeit, während Z 4942 i.a.ebenso wirksam, am lo.und 12.Tag der Kultur sogar signifikant wirksamer als Cyclophosphamid befunden wurde. Hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Wirkung war die Cyclophosphamidgruppe den Präparaten Chlorambucil und Manno-mustin etwa looo-fach überlegen.

Welche Vergleichsbefunde liefert nun die Literatur? Hierzu ist festzustellen, daß die Prüfung von E i n z e l d o s e n, soweit ersichtlich, nur in einem einzigen Fall (BERENBAUM, 1) erfolgte, während in der Regel die Testsubstanzen in Fünferserien verabfolgt wurde. Dem dürften methodische Faktoren zugrunde liegen. Das inaktive Versuchstier besitzt eine große Reserve immunologischer Stammzellen (13). Es konnte unter in-vivo-Kulturbedingungen gezeigt werden, daß der immunsuppressive Effekt einer konstanten Einzeldosis Cyclophosphamid sich umgekehrt pro-

portional zur Zahl immunologischer Stammzellen verhält, die dem Zytostatikum gegenüber stehen (9). Zumindest für Cyclophosphamid wurde eine sehr kurze Halbwertzeit gefunden (4,1o). Die Chance, im intakten Tier mit einer E i n z e l d o s i s eines rasch eliminierten Zytostatikums den Pool immunologischer Stammzellen so weit zu mindern, daß dies späterhin serologisch faßbar wird, ist also gering. So vermochte BERENBAUM (1) auch nur unter Anwendung höchster Zytostatikadosen (1/2 - 1 LD_{5o}^{1} nach unseren, relativ hohen Toxizitätsbefunden) den Titer von Agglutininen gegen S.typhi H zu senken. Dabei war der erzielte Titerschwund mit maximal 5 Stufen mäßig (vgl.Tab.3) und das Versuchsmodell, eine P r i m ä r r e a k t i o n, insofern relativ leicht beeinflußbar, als nach MAKINODAN und Mitarb. (13) die Zahl immunologischer Stammzellen bei Primärreaktionen nur etwa ein Hundertstel derjenigen bei Sekundärreaktionen ausmacht. Getestet wurden Cyclophosphamid, Melphalan, Tretamin, Thio-TEPA, Manno-mustin und Chlorambucil. Sie waren sämtlich immunsuppressiv wirksam.- SANTOS (21,22) sowie DIETRICH (6) prüften den immunsuppressiven Effekt von Fünferserien verschiedener Zytostatika, im übrigen ebenfalls an Primärreaktionen. Ihre Daten stellen die umfangreichsten Untersuchungen zu unserem Thema dar, umfassen aber dennoch nur 3 bzw. 4 der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Alkylantien. Von hervorragender Wirkung war in beiden Fällen Cyclophosphamid. Chlorambucil und Busulfan erwiesen sich bei SANTOS als wirkungslos. Der Effekt von Chlorambucil, Tretamin und Trenimon war bei DIETRICH, gemessen am therapeutischen Index LD_{5o}/ED_{5o}, in keiner Weise mit dem des Cyclophosphamid zu vergleichen.

Die serielle Anwendung zytostatischer Substanzen zur Prüfung ihrer immunsuppressiven Wirkung, wie sie etwa von SANTOS oder DIETRICH vorgenommen wurde, ist mit erheblichen Nachteilen behaftet. Sie erschwert Untersuchungen

zur Pharmakokinetik der Prüfsubstanzen. Eine Prüfung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Immunzytokinetik ist nur in groben Umrissen möglich, da die Behandlungs - serie stets mehrere Phasen des zytologischen Immunvorganges überlappt. Dies mag auch als Erklärung dafür gelten, daß der immunsuppressive Effekt der Testsubstanzen bei DIETRICH (6) sehr davon abhängig war, ob die Behandlungsserie vor, gleichzeitig mit bzw. nach dem Start der Testreaktion (Antigengabe) begonnen wurde.

Neu entwickelte Zytostatika werden, wie die Aufstellungen von SCHMIDT und Mitarb. (25) zeigen, systematisch auf ihre Toxizität gegenüber verschiedenen Tierstämmen und ebenso systematisch auf ihre kurative Wirkung bei verschiedenen Experimentaltumoren geprüft. Ein analoges System zur Prüfung der immunsuppressiven Wirkung existiert nicht, obzwar auch auf diesem Gebiet mit Fortschritten zu rechnen ist, wie beispielsweise der Vergleich von Cyclophosphamid mit dem verwandten Versuchspräparat Z 4942 (Tab.5) deutlich machte. Unter Rückgriff auf Erfahrungen der experimentellen Immunologie sollte die vorliegende Arbeit ein Testmodell vorstellen, das für die fortlaufende Testung immunsuppressiver Agentien unter Standardbedingungen geeignet scheint.

E. Zusammenfassung

Sensibilisierte Mäusemilzzellen wurden zusammen mit Schaferythrozyten in konstanter Dosis in strahleninaktivierten, isologen Wirtstieren zur Zweitreaktion gebracht. An dieser Testreaktion prüften wir den immunsuppressiven Effekt 11 verschiedener alkylierender Substanzen, deren LD_{50}^{1} in Vorversuchen an den von uns benutzten Mäusehybriden ($C31F_1$) bestimmt worden war. Das Zytostatikum wurde jeweils 18 Std nach Kulturbeginn (frühe Latenzphase) Gruppen von Wirtstieren intraperitoneal/ per os als Einzeldosis von unterschiedlicher Höhe verabfolgt (Experimentalgruppen). Parallel liefen nicht zytostatisch behandelte Kontroll - gruppen. Am 4.,8. und 12.Tag der Kultur erfolgten Blutentnahmen zur serologischen Untersuchung auf Schaferythrozyten-spezifische Agglutinine. Es folgte ein Vergleich der arithmetischen Mittel von Experimental- und jeweiliger Kontrollgruppe im t-Test (2P = o,o5) sowie ein Vergleich des immunsuppressiven Effekts von jeweils 1/4 LD_{50}^{1} der verschiedenen Alkylantien. Schwache immunsuppressive Effekte machten sich am ehesten am 4.Tag der Testreaktion bemerkbar, wurden aber am 8. und erst recht am 12.Tag durch das antikörperbildende System kompensiert. Cyclophosphamid sowie zwei von ihm abgeleitete Versuchspräparate (Z 4828 und Z 4942) hatten den stärksten Effekt, indem sie die Antikörpermenge am 8.Tag der Reaktion auf o,ol % der jeweiligen Kontrollen senkten; sie waren damit etwa looo-fach stärker wirksam als Chlorambucil und Manno-mustin, welche in äquitoxischer Dosis (1/4 LD_{50}^{1}) eine Immunsuppression unter 25 % der Kontrollen bewirkten. Tretamin, Trenimon, Thio-TEPA, Melphalan, Busulfan sowie Myelobromol waren in der gewählten Vergleichsdosis am 8.Tag unwirksam.

Tab. 1 Ergebnisse der Toxizitätsprüfung

I. Eigene Ergebnisse

II. bzw. III. Vergleichswerte aus der Literatur für LD_{50}^{1} bzw. LD_{50}^{5}.

Sofern nicht anders vermerkt, intraperitoneale Testung an der Maus (p.o. = orale, s.c. = subcutane, i.v. = intravenöse Applikation)

	I. LD_{50}^{1}	II. LD_{50}^{1}	III. LD_{50}^{5}
Cyclophosphamid	681,0	400,0 i.v.(3)	210,0 s.c.(6)
Z 4828	406,0	-----	-----
Z 4942	837,0	-----	-----
Tretamin	5,12	2,8 (24)	1,8 s.c.(6)
Trenimon	0,66	0,5 Ratte (8)	0,3 s.c.(6)
Thio-TEPA	30,7	23,0 (23)	-----
Melphalan	26,0	11,8 Ratte (18)	-----
Chlorambucil	46,6	18,5 Ratte (18)	35,0 s.c. (6)
Manno-mustin	118,0	90,0 (2)	-----
Busulfan	86,0 p.o.	125,0 (28)	-----
Myelobromol	2328,0 p.o.	2400,0 p.o.(5)	-----

Tab. 2 Immunsuppressiver Effekt von 11 alkylierenden Substanzen. Einzelwerte aufgetragen als $\log_2$-Titer

Cyclophosphamid

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
150,0	0,0,0,0,0,0,0,0	0,0,0,0,0,0,0,0	3,4,4,0,0,2,9,3
75,0	0,0,0,0,0,0,0,0	0,0,0,0,7,0,2, 15	0,5,4,7,5,11,7, 6
37,5	2,0,2,0,0,0,0,0	5,9,10,10,10,5, 12,11,10	7,10,11,11,15,8, 11,14,12
18,75	6,4,6,2,1,4,4	14,15,11,15,15, 17,14,16,16	16,14,16,17,16, 16,16,17
9,32	7,5,4,0,5,4	20,12,16,14,17, 15,14,4,8	13,13,14,16,18, 18,17,16
ø	6,8,8,9,8	15,16,17,19	15,21,21,21,20

fortgesetzt:

Z 4828

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
214,8	0,0,0,0,0,0,0	0,0,0,0,0,0,0,0	0,0,0,0,0,0,0
107,6	0,0,0,0,0,0,0,0	2,0,0,4,0,0,0,0	6,2,5,7,4,1,3,2
53,8	0,0,0,0,0,0,0	8,9,4,11,7,10	5,11,14,12,11
26,9	4,4,5,5,6,8	12,14,16,16,15, 17,16	13,19,19,18,16,16, 18
ø	9,9,10	16,17,18,16	17,20,16,17

Z 4942

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
520,0	0,0,0,0	0,7,0,1,0	11,12,4
260,0	0,0,0,0,1	3,3,3,1,0	3,0,0,0,0,0
180,0	0,2,0,0,0	2,1,2,1	3,2,2,1,0
90,0	0,0,0,0,1	1,4,1,3,3	9,8,8,11,11
ø	9,9,9,11	19,18,18,22	21,18,16,22

fortgesetzt:

Tretamin

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)	
	8	12
2,8	4,3,8,1	5,8,3,9
1,4	13,11,10,13	11,13,12,13,12
0,7	12,12,14	15,11,18,16
0,35	13,13,14,13	15,17,17,17,18
ø	13,12,14	15,15,16

Trenimon

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)	
	8	12
0,378	14,12,13,13	14,17,15
0,188	16,17,16,18,15	17,16,17,18,18
0,094	17,16,16,16,16	17,17,16,16,16
0,047	17,17,18,18,18	17,16,18,16,16
ø	16,15,15,14	17,16,16,15

fortgesetzt:

Thio- TEPA

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
10,0	6,3,0,0,4,2,4,4	15,18,19,15,14 16,16	14,19,19,16,15, 16
5,0	7,4,6,7,7,6,5,7	17,15,17,19,18, 15,17,15	18,19,18,17,16, 15,21
2,5	9,8,8,4,7,5,6,6	17,17,18,16,16, 18,17	17,17,19,16,16, 15,18,18
1,25	7,8,9,6,7,7,9, 10	16,19,20,16,17, 17,17,16	18,19,17,17,17, 16,20,21
ø	6,7,8,9	18,19,14,17	19,19,15,19

Melphalam

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
14,0	4,3,1,2,5,3,0	16,8,6,12,9,14, 17	15,15,18,7
7,0	10,3,6,5,5,8,3	17,16,17,19,20, 17	20,18,19,18,18, 16
3,5	10,6,8,6,9,12, 9	15,18,19,20,20, 20,21,22	22,19,21,13,19, 17,18,15
1,75	11,8,8,10,10, 11,11	17,19,20,21,20	20,21,22,20,19
0,88	10,7,10,9,8,9, 9	18,22,20,22,20, 21,22	21,23,22,19,22, 22,20
ø	10,9,11,12,9, 10	20,20,19,20,18, 20	21,20,20,21,20, 18

fortgesetzt:

Chlorambucil

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
23,0	0,2,0,5	12,6,9,4	17,10
11,5	2,0,0,2,0,2,4	12,14,17,14,16,13	14,17,17,16,14
5,75	7,9,8,7,4,3,6	12,16,18,15,19,15	12,18,16,16,19,14
2,38	8,9,7,8,6,7,8	14,16,18,16,19,18,17,18	19,17,19,20,18,16
1,19	9,12,10,9,9,9,8	14,18,21,17,19,17	19,20,16,18,16,18,18,18
ø	11,10,9,10,7,7,10	18,16,20,18,18,20,18	18,21,21,19,19,23,17

Manno-mustin

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
100,0	0,0,0,0,0,0,0,0,0,0,2	12,12,16,15,14,16,15	14,18
50,0	9,3,3,8,10,8,4,2,2,6,7,5	16,17,17,18,20,19,16,19,16	16,19,18,20,18,17,19
25,0	8,7,4,7,11,9,7,4,10,2,7	16,18,17,20,18,19,18,17,18,18,18	17,19,18,19,19,20,19,21,20,19
ø	11,9,9,11,12,12,12,8,10,12,13,11	20,20,20,21,19,20,23,21,18	20,22,23,21,24,19,17,19,20,19,21,20

fortgesetzt:

Busulfan (per os)

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
43,0	4,5,8,4,6,7,5,8	18,15,21,21,23, 18,22,20	15,17,22,22,18, 22,22
21,5	8,7,8,7,9,8,6,6	15,17,21,21,23, 19,22	17,18,21,20,19, 22,19
10,75	8,6,7,6,8,5,7,8	16,16,20,22,24, 23,23,19	17,17,19,22,18,22, 20,20
5,37	7,6,9,7,10,8,5, 7	15,18,21,21,23, 22,18,19	16,17,19,22,21, 25,17
2,68	9,7,7,7,9,7,7,7	15,16,20,22,14, 19,21,21	16,15,20,21,23, 24,20,21
ø	11,9,8,5,11,9, 6,8	19,17,20,22,22, 19,20	15,17,19,22,19,20, 18

fortgesetzt:

Myelobromol (per os)

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
950,0	8,7,9,7,8,7,7,7	13,16,16,18,16, 19,18,18	16,16,21,18,16, 20,18
475,0	10,9,9,7,8,4,7, 10	16,18,19,20,18, 18,17,18	18,18,21,20,19, 15,17,18
237,5	10,9,12,7,8,7, 5,8	15,17,18,19,16, 17,19	17,16,19,18,16, 18,18
168,75	11,9,8,7,9,6, 7,8	16,18,20,19,19, 19,16	17,19,20,20,17, 18
84,37	10,9,9,7,9,8,7, 9	16,19,18,19,15, 17,18	17,15,18,18,16, 20,18,13
Ø	11,9,11,8,8,9, 8,9	16,17,19,20,17, 17,17,18	17,21,18,17,18, 15,17,18

Tab. 3 Immunsuppressiver Effekt von 11 alkylierenden Substanzen. Arithmetisches Mittel der Einzelwerte von Tab. 2 mit Vertrauensbereich (2P = 0,05). Durch schwarze Umrandung hervorgehoben sind die Experimentellwerte, die im t-Test (2P = 0,05) signifikant von den entsprechenden Kontrollen differierten.

Cyclophosphamid

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
150,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	3,1 ± 2,40
75,0	0,0 ± 0,0	3,0 ± 4,53	[illegible] ± 2,22
35,7	0,5 ± 0,77	9,1 ± 1,91	[illegible] ± [illegible]
18,75	3,9 ± 1,88	14,1 ± 1,23	16,0 ± 0,77
9,32	4,2 ± 2,40	13,3 ± 3,75	15,6 ± 1,82
ø	7,8 ± 1,32	16,8 ± 2,71	19,6 ± 3,24

fortgesetzt:

Z 4828

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
214,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
107,6	0,0 ± 0,0	0,8 ± 1,25	3,8 ± 1,74
53,8	0,0 ± 0,0	8,2 ± 2,48	10,6 ± 4,18
26,9	5,3 ± 1,69	15,1 ± 1,74	17,0 ± 2,01
ø	9,3 ± 1,52	16,8 ± 1,51	17,5 ± 2,75

Z 4942

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
520,0	0,0 ± 0,0	1,6 ± 3,73	9,0 ± 9,94
260,0	0,2 ± 0,56	2,0 ± 1,75	0,5 ± 0,99
180,0	0,4 ± 1,11	1,5 ± 2,43	1,6 ± 1,39
90,0	0,2 ± 0,56	2,4 ± 1,69	9,4 ± 1,69
ø	9,5 ± 1,59	19,3 ± 2,46	19,3 ± 4,37

fortgesetzt:

Tretamin

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)	
	8	12
2,8	4,0 ± 4,67	6,3 ± 4,21
1,4	11,8 ± 1,92	12,2 ± 1,05
0,7	12,7 ± 2,99	15,0 ± 4,68
0,35	13,3 ± 0,76	16,8 ± 1,36
ø	13,0 ± 2,49	15,3 ± 2,61

Trenimon

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)	
	8	12
0,376	13,0 ± 1,29	15,3 ± 4,38
0,188	16,4 ± 1,42	17,2 ± 1,04
0,094	16,2 ± 0,56	16,4 ± 0,68
0,047	17,6 ± 0,68	16,6 ± 1,11
ø	15,0 ± 1,29	16,0 ± 1,29

fortgesetzt:

Thio-TEPA

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
10,0	2,9 ± 1,82	16,1 ± 4,46	16,5 ± 2,34
5,0	6,1 ± 0,99	16,6 ± 1,38	17,7 ± 1,88
2,5	6,6 ± 1,42	17,0 ± 0,75	17,0 ± 1,09
1,25	7,9 ± 1,05	17,3 ± 1,22	18,1 ± 1,55
Ø	7,5 ± 2,05	17,0 ± 3,43	18,0 ± 3,18

Melphalan

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
14,0	2,6 ± 1,59	11,7 ± 3,88	13,8 ± 7,49
7,0	5,7 ± 2,38	17,7 ± 1,55	18,2 ± 1,46
3,5	8,6 ± 1,99	19,4 ± 2,99	18,0 ± 2,48
1,75	9,9 ± 1,23	19,4 ± 1,88	20,4 ± 1,42
0,875	8,9 ± 0,98	20,7 ± 1,49	21,3 ± 1,06
Ø	10,2 ± 1,55	19,5 ± 0,83	20,0 ± 1,24

fortgesetzt:

Chlorambucil

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
23,0	1,7 ± 3,96	7,8 ± 4,74	13,5 ± 4,40
11,5	1,4 ± 1,40	14,3 ± 2,10	15,6 ± 1,86
5,75	6,3 ± 1,97	15,8 ± 2,74	15,8 ± 2,81
2,375	7,6 ± 1,67	17,0 ± 1,34	18,1 ± 1,98
1,187	9,4 ± 1,30	17,7 ± 2,29	17,9 ± 0,89
ø	9,1 ± 1,86	18,3 ± 1,25	19,7 ± 1,96

Manno-mustin

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
100,0	0,4 ± 0,63	14,3 ± 1,55	16,0 ± 2,50
50,0	5,6 ± 1,80	17,6 ± 1,37	18,1 ± 1,26
25,0	6,9 ± 1,81	17,9 ± 0,70	19,1 ± 0,80
ø	10,8 ± 1,22	20,0 ± 0,82	20,4 ± 1,28

fortgesetzt:

Busulfan

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
43,0	5,7 ± 1,16	19,8 ± 2,17	19,5 ± 3,44
21,5	7,4 ± 0,90	19,7 ± 2,71	19,4 ± 1,64
10,75	6,7 ± 1,35	20,3 ± 2,86	19,4 ± 1,98
5,37	7,3 ± 1,53	19,5 ± 2,57	19,6 ± 3,02
2,68	7,4 ± 1,09	18,4 ± 2,84	20,0 ± 2,81
ø	8,3 ± 1,91	19,6 ± 2,59	18,4 ± 2,52

Alle Werte sind insignifikant gegenüber der Kontrolle.

Myelobromol

Dosis in mg/kg	Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	4	8	12
950,0	7,5 ± 0,63	16,8 ± 1,60	18,0 ± 1,93
475,0	8,0 ± 1,67	18,0 ± 1,00	18,3 ± 1,53
237,5	8,3 ± 1,78	17,3 ± 1,42	17,4 ± 1,26
168,75	8,1 ± 1,31	18,1 ± 1,47	18,5 ± 1,45
84,37	7,4 ± 0,89	17,4 ± 1,45	16,9 ± 1,71
ø	9,1 ± 1,06	17,6 ± 1,12	17,6 ± 1,43

Tab. 4 Immunsuppressiver Effekt äquitoxischer Dosen von 11 alkylierenden Substanzen, ausgedrückt in

$$\% \text{ rel. Aktivität} = 2^{-(t_c - t_{exp})} \times 100$$

Vergleichsbasis: 1/4 LD_{50}^{1} (= Sollwert; Istwert = tatsächlich geprüfte Dosis)

Substanz	Dosis in mg/kg		Zeitpunkt der serologischen Untersuchung (Tage)		
	Soll-wert	Ist-wert	4	8	12
Cyclophosphamid	170,2	150,0	0,449	0,0009	0,0012
Z 4828	101,5	107,6	0,159	0,0015	0,0075
Z 4942	209,3	260,0	0,159	0,0006	0,0002
Tretamin	1,3	1,4	---	43,5	11,7
Thio-TEPA	7,7	10,0	4,12	53,5	35,3
Trenimon	0,17	0,19	----	100,0	100,0
Melphalan	6,5	7,0	4,42	28,7	28,7
Chlorambucil	11,5	11,5	0,481	6,25	5,83
Manno-mustin	29,5	25,0	6,7	23,3	40,7
Busulfan	21,5	21,5	53,5	100,0	100,0
Myelobromol	582,0	475,0	46,7	100,0	100,0

Tab. 5 Vergleichende Testung des immunsuppressiven Effekts von Cyclophosphamid, Z 4828 und Z 4942. Vergleichsbasis: 1/8 LD_{50}^{1}. Arithmetisches Mittel mit Vertrauensbereich (2P = 0,05; n = 11 -12)

Zeitpunkt d. serolog. Untersuchung (Tage)	Kontrolle	Cyclophosphamid	Z 4828	Z 4942
2	0,25 ± 0,39	0,36 ± 0,87	0,42 ± 0,57	0,17 ± 0,77
4	6,00 ± 0,85	0,09 ± 0,17	0,75 ± 0,19	0,66 ± 0,56
6	14,60 ± 0,94	0,0 ± 0,0	2,25 ± 1,55	0,08 ± 0,16
8	16,00 ± 0,83	0,66 ± 0,62	5,30 ± 0,92	0,08 ± 0,17
10	17,30 ± 1,04	2,20 ± 2,04	6,75 ± 1,88	0,66 ± 0,56
12	16,40 ± 1,14	4,20 ± 1,85	9,60 ± 1,96	2,50 ± 2,21

G. Literatur

1. BERENBAUM, M.C. — A Screen for Agents Inhibiting the Immune Response and the Growth of Tumors. Nature, London 196:384-385 (1962)

2. BOUDÈNE, C. — Rapport d'expertise toxicologique et pharmacologique concernant degranol. (Bouillet Lab., Paris 1960) unveröffentlicht

3. BURKERT, H. — (Asta-Werte AG.), persönliche Mitteilung

4. BROCK, H.E., HOHORST, H.-J. — Über die Aktivierung von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. Arzneimittelforsch. 13:1021-1031 (1963)

5. CSÁNYI, E., HORVÁTH, P. INSTITÓRIS, L. — Tumorhemmende, hämatologische und toxische Wirkung der 1,6-Dibrom-1,6-didesoxy-M-Mannits. Arzneimittelforsch. 14:670 (1964)

6. DIETRICH, F.M. — Inhibition of Antibody Formation to Sheep Erythrocytes by Various Tumor Inhibiting Chemicals. Int. Arch. Allergy 29:313-328 (1966)

7. GABRIELSON, A.E. and GOOD, R.T. — Chemical Suppression of Adaptive Immunity. In: Adv. Immunol. 6:91-229 (Academic Press, New York, 1967)

8. HECHT,G. und GLOXHUBER,C.
Toxikologische Untersuchungen mit zytostatisch wirksamen Äthylenimine-chinonen.
Med.u.Chem.(Farbenfabriken Bayer AG.) 7: 666-678 (1963)

9. HOPPE,I.
Der Einfluß von Zytostatika auf die Antikörperbildung in der In-Vivo-Kultur.
Proc.5th int.Congr.Chemother.III: 631-636, Wien (Verlag d.Wien.Med. Akad. 1967)

10. HOPPE,I., MASAOKA,T. und JAHN,E.
Faktoren mit Einfluß auf den immun-suppressiven Endoxaneffekt. I.Das Verhalten der immunologischen Stamm-zellen.
Verh.dtsch.Ges.inn.Med.74:1264-1267 (1968)

11. IPPEN,H.
Index Pharmacorum.
(Thieme,Stuttgart 1968)

12. KÄRBER,G.
Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche.
Arch.exp.Path.Pharmakol.162:480-483 (1931)

13. MAKINODAN,T.and ALBRIGHT,J.F.
Cellular Variation During the Immune Response: One Possible Model of Cellular Differentiation.
J.cell.comp.Physiol.(Suppl.1) 60: 129-144 (1962)

14. MAKINODAN,T., ALBRIGHT,J.F., PERKINS,E.H., NETTESHEIM,P.
Suppression of Immunologic Responses.
Med.Clin.N.Amer.49:1569-1596 (1965)

15. MAKINODAN,T., CAPALBO,P., CELADA,E. PERKINS,E.H.and ALBRIGHT,J.F.
Studies on immune reactions in In-Vivo cultures.
Proc.Int.Symposium on Tissue Trans-plantation, 73-86 (Universidad de Chile,Santiago 1962)

16. MAKINODAN,T., GENGOZIAN,N. and CONGDON,C.C. Agglutinin Production in Normal Sublethally Irradiated and Lethally Irradiated Mice Treated with Mouse Bone Marrow.
J.Immunol.77:25o-256 (1956)

17. MAKINODAN,T.and PETERSON,W.J. Relative Antibody-Forming Capacity of Spleen Cells as a Function of Age.
Proc.nat.Acad.Sci.Wash.48:234-238 (1962)

18. MORNINGTON,B. (Burroughs Wellcome u.Co.,London) persönliche Mitteilung

19. PABLÉ,K. (Lentia GmbH,München) persönliche Mitteilung

20. REWALD,E.and PELLITERO,C. Agglutinin Synthesis Regulation Independent of Antigen.
Acta.haemat.Basel 37:62-64 (1967)

21. SANTOS,G.W. Immunosuppressive drugs I
Fed.Proc.26:9o7-913 (1967)

22. SANTOS,G.W.and OWENS,A.H. A Comparison of the Effects of Selected Cytotoxic Agents on the Primary Agglutinin Response in Rats injected with Sheep Erythrocytes.
Bull.Johns Hopk.Hosp. 114:384-4o1 (1964)

23. SLOBODA,A. (American Cyanamid Company), private correspondance

24. SCHMIDT,K.H. Experimentelle und vergleichende Ergebnisse mit Triaethylenmelamin, N,N',N''-Triaethylenphosphorsäureamid und 6-Mercaptopurin.
Arzneimittelforsch.4: 146-161 (1954)

25. SCHMIDT,L.H., FRADKIN,R., SULLIVAN,R.and FLOWERS,A. — Cancer Chemotherapy Reports, Comparative Pharmacology of Alkylating Agents,Part 1: (Nat.sci.Center,Beth.,Md.1965)

26. SCHWARTZ,P. — Immunosuppressive Drugs Progr.Allergy 9:246-248 (1965)

27. STENDER,H.-S., RINGLEH,D., STRAUCH,D. und WINTER,H. — Die Beeinflussung der Antikörperbildung durch Zytostatika und Röntgenbestrahlung. Strahlentherapie(Sonderband) 43:392-399 (Urban u.Schwarzenberg,München-Berlin 1959)

28. STERNBERG,S.S., PHILIP,F.S.and SCHOLLER, P. — Pharmacological and Pathological Effects of Alkylating Agents. Ann.N.Y.Acad.Sci.68:811-825 (1958)

Lebenslauf

Am 23.Juni 1943 wurde ich, Judith Anne Whittaker, als zweites Kind der Eheleute Joseph Whittaker und Mildred Whittaker geborene Belcourt, in Woonsocket, Rhode Island, USA, geboren. Im Juni 196o beendete ich nach 12-jährigem Schulbesuch die Woonsocket High School mit dem klassischen high school diploma.

Vom Oktober 196o bis Juli 1962 studierte ich Chemie am Antioch College,Yellow Springs,Ohio,USA. Im November 1962 begann ich mein Medizinstudium, in dessen Rahmen ich die Universitäten Tübingen, Erlangen sowie schließlich die Freie Universität Berlin besuchte. Das Vorphysikum bestand ich in Tübingen im Oktober 1963 mit "gut" und das Physikum in Erlangen im August 1965 mit "sehr gut". Vom Wintersemester 1965/66 an studierte ich an der Freien Universität Berlin. Hier bestand ich als Abschluß meines Medizinstudiums das medizinische Staatsexamen mit "sehr gut".